

2/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008419024

WPI Acc No: 1990-306025/\*199041\*

**Nucleic acid probe label - with 5-bromo-2-deoxy-uridine as a tail of controllable no. of bases, detected after hybridisation by specific antibody**

Patent Assignee: LINDL T (LIND-I)

Inventor: JIRIKOWSKY G; LINDL T; ORTIGAO F; SELIGER H

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3910151	A	19901004	DE 3910151	A	19890329	199041 B

Priority Applications (No Type Date): DE 3910151 A 19890329

Abstract (Basic): DE 3910151 A

Prepn. of DNA or RNA molecular probes (A) which are labelled at the 3'- or 5'-OH end with a selected no. of 5'-bromo-2'-deoxy-uridines (I), or other immunogenic, structurally-modified nucleotide base analogue, comprises enzymatic or chemical syntheses, e.g. condensation of activatable nucleotide synthons.

(A) can be any sort of DNA or RNA fragment which is long enough to hybridise with target nucleic acid.

USE/ADVANTAGE - (A) can be used (i) to detect specific gene segments; (2) to examine gene expression, gene mobility or genotypes, (3) to diagnose hereditary diseases; (4) for genetic typing; (5) to detect pathogens and pathogenic (or other biological) processes, (6) to purify viruses or other nucleic acid contg. materials; (7) for solid-phase sequencing of nucleic acid, and (8) as amplification primers in polymerase chain reactions. The no. of (I) molecules incorporated .

Dwg.0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C12P-019/34;  
C12Q-001/68

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift  
⑪ DE 39 10 151 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 39 10 151.7  
㉔ Anmeldetag: 29. 3. 89  
㉕ Offenlegungstag: 4. 10. 90

⑤ Int. Cl. 5:  
C 07 H 21/04  
C 12 P 19/34  
C 12 Q 1/68  
C 07 H 21/02

DE 39 10 151 A 1

㉚ Anmelder:

Lindl, Toni, Dr., 8000 München, DE; Seliger, Hartmut,  
Prof. Dr., 7915 Elchingen, DE; Ortigao, Flavio  
Ramalho, Dipl.-Chem.; Jirikowsky, Gustav, Dr., 7900  
Ulm, DE

㉚ Erfinder:

gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 5'-Bromo-2'-desoxyuridinmarkierte DNA- oder RNA- Sonden

Die Erfindung betrifft die Herstellung und Anwendung von DNA- bzw. RNA-Molekularsonden, die mit 5'-Bromodeoxyuridin oder mit anderen geeigneten modifizierten, immunogen wirksamen Basenanaloga am 3'-OH- oder am 5'-OH-Ende der Polynukleotidkette mittels enzymatischer oder chemischer Methoden markiert sind.

Als DNA- oder RNA-Sonden werden alle geeigneten DNA- oder RNA-Polymere verstanden, die entweder BrdUrd oder andere geeignete modifizierte Basenanaloga in beliebig großer Zahl am 3'-OH- oder am 5'-OH-Ende ihrer Kette enthalten.

Insbesondere soll die Anwendung dieser mit 5'-Bromodeoxyuridin oder mit anderen geeigneten Basenanaloga markierten DNA- oder RNA-Proben für Hybridisationstechniken, für Festphasentechniken und zum Einsatz in der Polymerasekettenreaktion geschützt werden.

Es sollen diese Sonden zur Diagnose von Infektionserregern, zur Entdeckung von Tumormarkern, zur Entdeckung von Erbkrankheiten, von Mutationsprozessen innerhalb von Zellen und anderen DNA- oder RNA-abhängigen Prozessen in der Zelle mittels der obengenannten Techniken verwendet werden.

DE 39 10 151 A 1

## Allgemeines zum Stand der Technik

Die Technik der Anwendung von synthetischer oder genomischer DNA bzw. RNA zur medizinisch-biologischen Diagnose von DNA- bzw. RNA-bedingten Vorgängen in der Zelle bzw. zur direkten Nachweise von DNA- bzw. RNA über einen sog. Hybridisierungsvorgang wird in den letzten 10 Jahren immer häufiger verwendet. Dabei nutzt man die Tatsache aus, daß DNA bzw. RNA als Träger der genetischen Information Polyanionen darstellen, bei denen an einer Phosphatribose- oder Desoxyphosphatribose-Matrix die eigentlichen Träger der Erbinformation, die Purine Adenin und Guanin und die Pyrimidine Thymidin bzw. Uracil und Cytosin gebunden sind, wobei die Aufeinanderfolge dieser Nukleotide die eigentliche Erbinformation bedingen. Diese heterozyklischen Verbindungen können über van der Waalsche Kräfte die Heterodimeren Adenosin-Thymidin (bzw. Thymidin-Uridin) und Guanosin-Cytosin bilden. Die Bindung ist abhängig von Natrium- bzw. Kaliumionen und kann zu einem thermodynamisch stabilen Komplex führen, wenn mehr als 10–15 passende Paarungen in direkter Reihenfolge vorhanden sind. Die Stabilität dieser Doppelstränge ist abhängig von der Basenfolge und davon, ob sich Ribose oder Desoxyribose im Molekül befinden. Der Vorgang der Trennung dieser Doppelstränge in Einzelstränge kann durch Hitze und/oder hohe Salzkonzentrationen bewirkt werden. Als Hybridisierung wird jener Vorgang bezeichnet, wenn die Bildung solcher DNA- bzw. RNA-Doppelstränge durch passende Einzelstränge herbeigeführt wird, die aus unterschiedlichen Quellen stammen. Die Methode der DNA- bzw. RNA-Hybridisierung wird seit ca. 20 Jahren angewandt, um mit gut charakterisierten Suchnukleinsäuren (Molekularsonden, DNA- bzw. RNA-Proben) entsprechende Sequenzen in biologischem Material nachzuweisen. Die Hybridisierung kann auf festem Trägermaterial, in der Zelle direkt oder in Lösung durchgeführt werden.

Die Herstellung von solchen Suchproben kann über verschiedenste Wege erfolgen. Dabei ist es von großer Bedeutung, daß diese Proben eine entsprechend hohe Spezifität haben und als solche einwandfrei nachzuweisen sind. Sie können über chemische Methoden, über enzymatische Methoden oder über rekombinante Plasmidvektoren o. ä. hergestellt werden, wobei als Ausgangsmaterial sowohl genomische DNA oder RNA verwendet werden kann als auch künstlich hergestellte Nukleotidsequenzen. Von entscheidender Bedeutung ist die Markierung dieser Suchproben, wobei es prinzipiell zwei Methoden gibt:

1. Die Markierung dieser Suchproben in vivo, d. h. als metabolische Markierung z. B. von eingebauten DNA- bzw. RNA-Bruchstücken in Plasmidvektoren in Bakterien vor allem mittels radioaktiver Precursormoleküle. Hier wird neben anderen Nukleotiden auch als nicht-radioaktive Base 5'-Bromdesoxyuridin verwendet. Die in vivo-Markierung hat große Nachteile, ist umständlich zu handhaben und wird heute kaum mehr zur Markierung solcher Proben verwendet.

2. Die Markierung der Proben nachträglich in vitro. Der älteste Weg dieser Markierung ist die Verwendung bakterieller DNA- bzw. RNA-abhängiger DNA- bzw. RNA-Polymerasen, um z. B. aus einer viralen, einsträngigen DNA eine komplementäre RNA abzulesen oder

umgekehrt.

Eine inzwischen klassische Methode ist die der Nick-Translation. Hierbei werden in eine doppelsträngige DNA durch sehr geringe Mengen von DNase kleine Brüche induziert. Durch den Einsatz von DNA-Polymerase I aus *E. coli* werden nun diese Brüche vom 5'-OH-Ende in Richtung 3'-OH-Ende der DNA erweitert und am freien 3'-OH-Ende des Bruches wird unter Verwendung radioaktiv markierter Nukleosidtriphosphate oder anderer geeigneter markierter Basen ein neuer Strang synthetisiert. Dieses Verfahren ist in den letzten Jahren weiter modifiziert worden, wobei vor allem der Einbau von nicht radioaktiv markierten Basenanaloga in die DNA eine zunehmende Rolle spielte. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, daß auch BrdUrd mittels diese Methode (Nick-Translation) in die DNA eingebaut werden kann und mittels monoklonaler Antikörper und konventioneller immunhistologischer Techniken nachgewiesen werden kann. Allerdings ist hierbei die Nachweisempfindlichkeit deutlich geringer als bei der radioaktiven Markierung. Eine weitere Methode ist die Verwendung von RNA und der Reverse Transkriptase, die aus dem RNA-Molekül eine c-DNA bilden kann, wobei dann die unmarkierte RNA später durch eine RNase zerstört wird. Weiterhin können radioaktiv markierte Jodisotope in Gegenwart von Thallium in Einzelstrang-DNA bzw. -RNA eingebaut werden.

Photoaktivierbare Substanzen können ebenfalls in einer direkten Reaktion in die Einzelstrang-DNA bzw. in die -RNA eingebaut werden, so z. B. Photobiotin oder ähnliche Substanzen.

Weiterhin kann Cytosin in einer Einzelstrang-DNA bzw. in der -RNA chemisch so modifiziert werden, daß antigene Gruppen, die als Signaltransducer wirken können, in das Molekül eingebaut und später über Antikörper nachgewiesen werden können.

Eine alternative Methode basiert auf der Verwendung von unmarkierter rekombinanter DNA als Hybridisierungsprobe und der Verwendung einer zweiten markierten Probe, die eine Sequenz erkennt, die allen spezifischen Suchproben gemeinsam ist. Dabei wird in einem zweiten Hybridisierungsschritt die markierte Nukleinsäure verwendet.

Weiterhin wurde versucht, die Such-DNA bzw. -RNA am 3'-OH-Ende der Kette zu markieren, wobei bisher Dinitrophenolderivate, Fluorescein- oder Tetramethylrhodaminadenosinderivate benutzt wurden. Eine weitere Methode der endständigen 3'-OH-Markierung umfaßt die Benutzung von poly-A-Sequenzen, die mit Hilfe der Terminaltransferase (E.C. 2.7.7.31), ATP und einer Polynukleotidphosphorylase (E.C. 2.7.7.8) bis zu 8000 Adenosinmonophosphat(AMP)-Moleküle anhängen kann. Die Probe wird danach mittels einer Polynukleotidphosphorylase vom ADP befreit und das freigesetzte ADP mittels Pyruvate Kinase (E.C. 2.7.1.40) und Phosphoenolpyruvat zu ATP umgesetzt. Das entstandene ATP kann mittels Luciferin und Luciferasereaktion quantifiziert werden.

Die vorstehend aufgeführten Nachweismethoden haben in der Regel eine Empfindlichkeit von attomolar bis femtomolar, wobei bisher die radioaktiv markierten Proben den nicht radioaktiv markierten Proben in der Empfindlichkeit überlegen waren.

Allerdings müssen die radioaktiv markierten Proben einer längeren Inkubationszeit zur Erkennung mittels Autoradiographie unterworfen werden, während nicht radioaktiv markierte Proben eine kürzere Zeit zu ihrer Quantifizierung benötigen. Doch gab es bisher noch kei-

ne Möglichkeit, einzelne DNA- bzw. RNA-Moleküle mittels solcher Methoden direkt nachzuweisen. Auch im täglichen Routineeinsatz erwiesen sich die bisherigen Verfahren als noch nicht praktikabel, da sie entweder zu lange dauerten (das autoradiographische Verfahren kann sich über Wochen hinziehen), hohe Auflagen hinsichtlich der Laborausstattung bedingten oder zu wenig empfindlich (besonders bei den nicht radioaktiven Proben) waren.

Weiterhin waren bestimmte nicht radioaktiv markierte Proben störanfällig, da sie entweder Moleküle enthielten (wie z. B. Biotin), die endogen auch in der Zelle sich befinden (zu hohe Hintergrundsreaktion) oder die bei der Hybridisierung der Einzelstränge störten (so z. B. der hydrophobe Spacer bei den biotinylierten oder digoxigenierten Proben). Weiterhin waren die Nachweisgrenzen der nichtradioaktiv markierten Proben durch die Tatsache limitiert, daß sich die nachzuweisenden Basenanaloga innerhalb der Doppelhelix nach der Hybridisierung befanden und so einem Nachweis, z. B. mittels Antikörpertechnik o. ä. schwer zugänglich waren.

### 3) Beschreibung und Vorteile des zu schützenden Verfahrens:

Es wird hier ein Verfahren beschrieben, das es ermöglicht, in matrizen-unabhängiger enzymkatalysierter Reaktion terminal BrdUrd-Einheiten an einzelsträngige Oligonukleotide zum Zwecke der Sondenmarkierung anzubringen. Es beruht auf der Umsetzung eines Oligonukleotids (vorzugsweise eines chemisch synthetisierten oder aus biologischer DNA oder RNA ausgeschnittenen Oligonukleotids) mit 5-Bromo-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat vorzugsweise unter Katalyse durch Desoxynukleotidylterminaltransferase. Dabei stellte es sich heraus, daß das Enzym, — es war bisher nur für den Einbau mit strukturell unmodifizierten Nukleotiden verwendet worden —, schnell und effizient die BrdUrd-Einheiten an die Oligonukleotide 3'terminal einbaut und zwar je nach Reaktionszeit und Substratkonzentration zwischen ca. 10 und 70 BrdUrd-Reste.

Alternativ können chemosynthetisch Bromdesoxyuridylat- oder andere immunogene Nukleotideinheiten an den 3'- oder 5'-Terminus einer Oligonukleotidkette angefügt werden. Dies erfolgt durch Einsetzen eines geeigneten, von 5-Brom-2'-desoxyuridin oder einem anderen erfindungsgemäß z. B. 5-Brom-5'-di(anisyl)-phenylmethyl-uridin-3'(-methoxy- oder  $\beta$ -cyanoethoxy)-phosphorsäure-(N,N'-diisopropyl)-amid, in die chemische Oligonukleotidsynthese, vorzugsweise an fester Phase.

Folgende Reaktionsbeispiele werden nachfolgend aufgeführt:

#### a) Herstellung und Nachweis von Oxytocin-RNA in Nervenzellen:

##### 1. Beispiel: Markierung einer synthetischen Oxytocinprobe:

Ein typischer Reaktionsansatz sieht folgendermaßen aus:

Es werden zunächst in geeignete Reaktionsgefäße folgende Reagenzien eingesetzt:

5  $\mu$ l Reaktionspuffer (z. B.: Cacodylatpuffer 100 mM, der noch zusätzlich 100 mg/ml Rinderserumalbumin, 1 mMol CoCl<sub>2</sub> und 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält)

5  $\mu$ l BrdUrd-Triphosphat-Lösung (zwischen 1 mM und 1 nM je nach Erfordernis)

5  $\mu$ l nicht markierte Oxytocin-Probe (zwischen 100  $\mu$ mol und 1 picomol)

1–1000 Einheiten einer terminalen Desoxynucleotidtransferase.

Die Reaktionslösung wird bei 37°C für 1 bis 60 min in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l inkubiert und die Reaktion wird anschließend durch Erhitzen gestoppt.

Die Trennung des nicht eingebauten BrdUrd-triphosphats wird an Sephadex G-50 vorgenommen, wobei als Eluat 10  $\mu$ M Tris- 1 mM EDTA pH 7,5 verwendet wird.

Nach der Reinigung wird die markierte Probe auf konventionelle Art (Erhitzen der nachzuweisenden DNA- oder RNA-Proben oder Denaturierung mittels Säuren und anschließende Rehybridisierung mit der markierten Probe) in situ mit der zu detektierenden Oxytocin-RNA in Nervenzellen hybridisiert. Der Nachweis der Proben erfolgt mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen Bromdesoxyuridin und nachfolgender immunhistochemischer Detektion, wobei ein biotinylierter Anti-Maus-Antikörper, verwendet wird. Anschließend wird mit Streptavidinperoxidase inkubiert und die Peroxidase wird mit 3,3'-Diaminobenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen.

Die nachgewiesene Empfindlichkeit liegt in der gleichen Größenordnung wie dies bei <sup>32</sup>P-markierten Oxytocin-DNA-Proben der Fall ist, wobei die subzelluläre Auflösung nach der immunhistochemischen Färbung besser ist als die Auflösung der radioaktiv-markierten Probe nach erfolgter autoradiographischer Erkennung.

##### 2. Beispiel: Vergleich der Empfindlichkeit von <sup>32</sup>Phosphor-markierten und mit BrdUrd-markierten synthetischen ras-Probe mittels Dot-Blot-Verfahrens:

Zu diesem Zwecke wird eine synthetische Oligonukleotidprobe (ras-Gen, 20 Basenpaare) entweder mit <sup>32</sup>P markiert oder mittels Terminaltransferasereaktion (s. o.) mit BrdUrd markiert. Nach ca. 60 min Inkubationszeit waren ca. 70 BrdUrd-Moleküle am 3'-OH-Ende der synthetischen Probe fixiert, was durch konventionelle DNA-Elektrophorese gezeigt werden konnte.

Nun wurden entweder die radioaktiv markierten Proben oder die mit BrdUrd-markierten Proben auf eine Biotin-Membran (Fa. Pall) mit einer in Zellen amplifizierten DNA, die das ras-Gen codiert, hybridisiert. Es wurden verschiedene Verdünnungen der zellulären DNA auf die Membran aufgetragen (von 10  $\mu$ g DNA pro Membran bis 0,5  $\mu$ g DNA), um die Empfindlichkeitsgrenzen der jeweiligen Nachweismethoden zu testen. Während bei der radioaktiven Probe die Membranen einer Autoradiographie unterzogen wurden, wurden die mit BrdUrd-markierten DNA-Hybride zunächst mit einem monoklonalen Antikörper gegen BrdUrd und anschließend mit einem biotinylierten Anti-Maus-Antikörper inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde Streptavidin-markierte Peroxidase zugesetzt und der Komplex wurde mittels 3,3-Diaminobenzidin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen. Dabei stellte es sich heraus, daß die Empfindlichkeit der beiden Proben identisch waren. Bei beiden Proben waren noch 50 pg DNA/ml nachweisbar.

Die Vorteile dieser Methode gegenüber den bisherigen nicht-radioaktiv markierten Verfahren sind nachfolgende:

1. Das endständige Bromdesoxyuridin wird von der Terminaltransferase oder von anderen geeigneten Enzymen wie ein normales Nukleotid an das 3'-OH- bzw. an das 5'-OH-Ende der Probe eingebaut und in bestimmten Grenzen kann die Anzahl der Bromdesoxyuridinmoleküle durch Variation der Inkubationszeit und -temperatur vorherbestimmt werden.

2. Weiterhin wird die Reaktion der Terminaltransferase oder der anderen Transferasen nicht durch Spacer oder andere große Molekülteile des einzubauenden Nukleo-

tidanalogs behindert, so daß ein bessere Ausbeute und besseres Handhaben der Terminaltransferase-Reaktion gewährleistet ist.

3. Auf chemischem Wege ist ebenfalls ein besserer Einbau via Phosphoramidatester möglich, da keine hydrophoben Anteile und keine weiteren sterisch wirksamen Substituierungen des Basenanalogs die Reaktion behindern.

4. Weiterhin stören die BrdUrd-Moleküle nicht bei der nachfolgenden Hybridisierung, noch ist zu erwarten, daß die Poly-BrdUrd-Kette am Ende mit anderen Sequenzen der nachzuweisenden DNA bzw. RNA hybridisiert noch daß sie bei der spezifischen Hybridisierung überhaupt stören könnte.

5. Ferner kann in bestimmten Grenzen durch das Anbringen von BrdUrd an das Ende eine Empfindlichkeitssteigerung erreicht werden, da die BrdUrd-Moleküle nicht, wie bei der ungerichteten in vivo- bzw. in vitro-Markierung, innerhalb des Moleküls liegen und so bei der Hybridisierungsreaktion nicht innerhalb der Doppelhelix zu liegen kommen, wo sie sehr schwer vom Antikörper detektiert werden können, sondern daß die BrdUrd-Moleküle außerhalb des Hybridisierungsbereiches liegen und so weder sterisch noch anders die Hybridisierungsreaktion stören können und einer Erkennung durch den Antikörper leichter zugänglich sind. Die hinreichende Bereitstellung von BrdUrd-Einheiten an das Ende der Oligonukleotidkette hat auch zur Folge, daß eine hinreichende Anzahl von Bindungsstellen für den Antikörper bereitstehen, was die Detektion z. B. gegenüber einer Anbindung eines einzigen Biotinrests vereinfacht.

6. Darüber hinaus führt es zu einer erheblichen Empfindlichkeitssteigerung gegenüber den bisherigen nicht-radioaktiven Verfahren und zu einer gleichwertigen Empfindlichkeit wie bei den radioaktiv markierten Proben, ohne daß hier die langen Autoradiographiezeiten in Kauf genommen werden müssen. Weiterhin wird jede Interferenz mit natürlich in den Zellen oder im Gewebe vorkommenden Molekülen (wie z. B. Biotin) vollständig vermieden, da BrdUrd bzw. andere immunogene Basenanaloga normal nicht vorkommen.

4) Die Verwendung dieser so markierten Proben soll folgende Gebiete umfassen:

- a) Nachweis von definierten Gensegmenten bei molekularbiologischen und gentechnologischen Arbeiten,
- b) bei der Untersuchung von Geneexpressionen,
- c) bei der Untersuchung von Genmobilität,
- d) bei der Untersuchung des Genotyps,
- e) bei der Erkennung von Erbkrankheiten,
- f) bei der Typisierung von individuellen Erbanlagen (z. B. HLA-Typisierung, in der Kriminalistik o. ä.),
- g) beim quantitativen und qualitativen Nachweis von Krankheitserregern,
- h) beim Nachweis pathologischer Vorgänge innerhalb der zellulären DNA bzw. RNA,
- i) bei der Erkennung sonstiger biologischer Vorgänge innerhalb der Zelle, die auf DNA- bzw. RNA-Ebene ablaufen,
- j) bei der Reinigung von Viren oder von anderen nukleinsäurehaltigen biologischen oder anderen Proben, die synthetische oder genomische DNA- bzw. RNA enthalten,
- k) insbesondere ist die Anwendung solcher Proben bei der Erstellung von sog. Genbibliotheken angezeigt, wobei damit eine einzelne interessierende

Gensequenz detektiert werden kann,

l) weiterhin ist die Verwendung solcher Proben bei der Festphasensequenzierung von DNA oder RNA bzw. bei der Herstellung von größeren synthetischen Nukleotidketten vorgesehen,

m) bei der Anwendung von BrdUrd und anderen immunogenen Nukleotidanaloga als Amplifizierungseinheiten in der sog. Polymerase-Kettenreaktion (PCR-Methode).

#### Literatur:

##### 1. Zur Hybridisierung allgemein:

- a) J. Stavrianopoulos, Y. Heuy-Lan and N. E. Keller: Europ. Patent Application EP 01 33 473 A2 from 04. 07. 1984,
- b) J. A. Matthews and L. J. Kricka: Analytical Strategies for the Use of DNA Probes. Analytical Biochemistry 169(1988) 1—25,
- c) H. U. Wolf, et. al.: Möglichkeiten und Grenzen der Diagnostik mit DNA-Proben. Lab. med. 10 (1986) 229—234.

##### 2. Zur BrdUrd-Markierung:

- a) G. Niedobitek, T. Finn, H. Herbst, G. Böhnhöft, J. Gerdes and H. Stein: Detection of Viral DNA by In-Situ Hybridisation Using Bromodeoxyuridine Labelled DNA Probes. Am. J. Pathology 131 (1988) 1—4,
- b) H. Sakamoto et. al.: 5-Bromodeoxyuridine in Vivo Labeling of M13 DNA, and its Use as a Non-radioactive Probe for Hybridization Experiments. Molec. and Cell. Probes 1(1987) 109—120,
- c) H. Seliger et. al.: in: Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments. (H. G. Gassen und A. Lang; eds.) Verlag Chemie Weinheim, 1982, 81—96.

##### 3. Zur Oxytocin- bzw. ras-DNA:

- a) G. F. Jirikowski et al.: In Situ Hybridization with Complementary Synthetic Oligonucleotide and Immunocytochemistry: A Combination of Methods to Study Transcription and Secretion of Oxytocin by Hypothalamic Neurons. Molec. and Cellular Probes 2(1988) 59—64,
- b) K. B. Mullis, and F. A. Falloona: In Methods in Enzymology Vol. 155(1987) 335.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von DNA- bzw. RNA-Molekularsonden, die mit 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdUrd) oder anderen immunogen strukturell modifizierten Nukleotidbasenanaloga am 3'- bzw. 5'-OH-Ende der DNA- bzw. RNA-Kette mit beliebig vielen Molekülen markiert sind. Dabei wird unter Molekularsonden jede Art von DNA- oder RNA-Fragmenten verstanden, die eine geeignete biologische Information und eine geeignete Länge für die Hybridisierung an biologische RNA oder DNA besitzen. Dabei ist es gleichgültig, auf welchem Wege die BrdUrd-Moleküle oder die anderen halogenierten Nukleotidbasenanaloga eingebaut werden, entweder enzymatisch oder via chemische Synthese, zum Beispiel über die Ankondensation von aktivierbaren Nukleotidsynthons.

2. Die Verwendung dieser nach 1 markierten Molekularsonden für medizinisch-biologische Zwecke, vor allem zur Diagnose von pathologischen Vorgängen, zur Erkennung von Infektionskrankheiten, zur Bestimmung genetisch bedingter Krankheiten, zur Diagnose individueller Merkmale und zur Analyse des Genoms aus tierischem, pflanzlichem und menschlichem Zellmaterial. Dabei sollen die so markierten Molekularsonden sowohl direkt (Dot-Blot-Analysen oder in-situ-Hybridisierungen) als auch indirekt (als Amplimer in der sog. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR-Methode)) zum Nachweis der Ziel-DNA oder -RNA eingesetzt werden.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

— Leerseite —